金黄色葡萄球菌 arl 双组份信号转导系统受体蛋白 $ArlS_{CA}$ 的表达、纯化及活性研究

王路路[1,2], 权春善[2,3]*, 许永斌[2,3], 陈金利[2,3], 吴懿[2,3], 王冠天[2,3], 董悦生[1]

([1]大连理工大学环境与生命学院, 大连 116024; [2]大连民族大学生物技术与资源利用-教育部重点实验室，大连 116600; [3]大连民族大学生命科学学院，大连 116600)

摘要 金黄色葡萄球菌是一类重要的病原菌，其毒力因子的表达及分泌过程由多种双组份信号转导系统（two component signal transduction system, TCSTS）共同调控，其中 ArlRS 双组份信号转导系统与细菌的生长和分裂密切相关。ArlRS 双组份系统的信号传递通过组氨酸激酶 ArlS 磷酸化实现, ArlS 的胞内域被认为是调控毒力因子表达的重要功能域，本文以 ArlS 蛋白的胞内域部分即 $ArlS_{CA}$ 为目标蛋白进行相关的活性研究。首先构建 pProEX-HTa-arls 和 pProEX-HTa-arlr 重组质粒，对目的蛋白进行诱导表达。其次，利用金属离子螯合层析、离子交换层析以及凝胶过滤层析方法对目的蛋白进行分离纯化，纯化后的 ArlR 蛋白纯度可达 98%，产量约为 25 mg/L；纯化后的 ArlS 蛋白纯度可达 90%，产量约为 15 mg/L。圆二色谱检测结果显示纯化后的目的蛋白有完整的二级结构, 体外磷酸化结果显示，ArlS 蛋白具有激酶活性, 自磷酸化后可以将磷酸基团转移给反应调控蛋白 ArlR。最后，利用定点突变的方法，构建了 418 位和 420 位氨基酸残基突变的表达载体 pProEX-HTa-$ArlS_{CAG418A}$ 和 pProEX-HTa-$ArlS_{CAG420A}$。$ArlS_{CAG418A}$ 和 $ArlS_{CAG420A}$ 蛋白不具有激酶活性，说明 418 位和 420 位氨基酸残基在 ArlS 蛋白的自磷酸过程中起着关键作用。

关键词 金黄色葡萄球菌；$ArlS_{CA}$；蛋白纯化；激酶活性

Expression, Purification and Functional Assay of $ArlS_{CA}$ from *Staphylococcus aureus*

WANG Lu-lu[1,2], QUAN Chun-shan[2,3]*, XU Yong-bin[2,3], CHEN Jin-li[2,3], WU Yi[2,3], WANG Guan-tian[2,3], DONG Yue-sheng[1]

([1]School Environment & Biological Science & Technology, Dalian University of Technology, Dalian, 116024; [2]Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Dalian, 116000; [3]College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian, 116600）

*通讯作者，电子邮箱：mikyeken@dlnu.edu.cn
国家自然科学基金(21272031),(21372037)及中央高校基本科研业务费专项资金（DC201502020201）资助项目

Abstract *Staphylococcus aureus* is a crucial opportunistic pathogen, and the expression of virulence factors in *S. aureus* is regulated by various of two component signal transduction systems (TCSTs). ArlRS TCST has a close relation with the growth and division of bacteria, and the signal transduction of ArlRS TCST is implemented by the autophosphorylation of histidine kinase ArlS. The intracellular domain of ArlS is regarded as an important functional domain that regulates the expression of virulence factors. In this study, the research focus on the kinase activity and function of the intracellular domain of ArlS. The recombinant plasmids pProEX-HTa-arls and pProEX-HTa-arlr were constructed and the target proteins were overexpressed in *E. coli* BL21. Then different kinds of isolation technologies such as the metal ion affinity chromatography, the ion exchange chromatography and the gel filtration chromatography were used for purification of the recombinant proteins. The production of ArlR can reach 25 mg with about 98% purity from one liter culture medium, and the production of ArlS can reach 15 mg with about 90% purity from one liter culture medium. The circular dichroism detection results showed that the purified ArlR has natural secondary structure. In vitro phosphorylation results showed that ArlS exhibited kinase activity and the ability of autophosphorylation. Furthermore, the phosphorylated ArlS can transfer the phosphate groups to the response regulator protein ArlR. Finally, the recombinant plasmids pProEX-HTa-$ArlS_{CAG418A}$ and pProEX-HTa-$ArlS_{CAG420A}$ were constructed by the method of site-direted mutation, and proteins of $ArlS_{CAG418A}$ and $ArlS_{CAG420A}$ were purified using the metal ion affinity chromatography. The results showed that $ArlS_{CAG418A}$ and $ArlS_{CAG420A}$ did not have the kinase activity, illustrating that the amino acid residues at 418 and 420 are crucial to the autophosphorylation process of ArlS.

Key words *Staphylococcus aureus*; $ArlS_{CA}$; purification; kinase activity

金黄色葡萄球菌是机具危害的人类病原菌，具有较高的致死率 [1]，约有 30% 的正常人群也长期携带着该菌[2]。金黄色葡萄球菌可引起伤口的化脓感染，亦可诱发内脏器官感染，导致肺炎，心内膜炎及脓毒血症等疾病[3,4]，致使病人免疫能力的降低甚至死亡。目前，医院主要通过抗生素来治疗由金黄色葡萄球菌引

起的疾病感染。近几十年，先后出现了耐青霉素菌株、耐甲氧西林菌株和耐万古霉素菌株等耐药性菌株，这些超级细菌的出现为相关疾病的治疗带来了巨大的困难，因此发现抗菌靶点和开发新的抗菌药物迫在眉睫[5-10]。

金黄色葡萄球菌的致病机制与其能分泌多种细胞外毒素及胞外酶密切相关[2,11]，而这些毒力因子的表达受多个基因组成的网络调控，过程十分复杂。研究表明，agr、srr、arl、sae、lyt、wal 等多个双组份信号转导系统均参与这些毒力因子的调控过程[12]，其中 arl 系统是最重要的双组份信号转导系统之一。arl 系统由组氨酸激酶蛋白 ArlS 和反应调控蛋白 ArlR 构成[2,3]，ArlRS 可作为全面调控因子，直接或间接调节多种基因的表达[13]，与金黄色葡萄球菌的致病性密切相关。我们利用在线软件预测 ArlS 蛋白含有两个跨膜片段和一个较大的胞内域结构（见图 1 A ），蛋白胞内域部分含有两个结构域分别是组氨酸自身磷酸化位点和 ATP 结合的激酶功能区；ArlR 包含两个结构域，N 端含有接受自组氨酸蛋白激酶转移的磷酸基团位点，C 端有含 DNA 结合位点的效应区[2,14,15]。

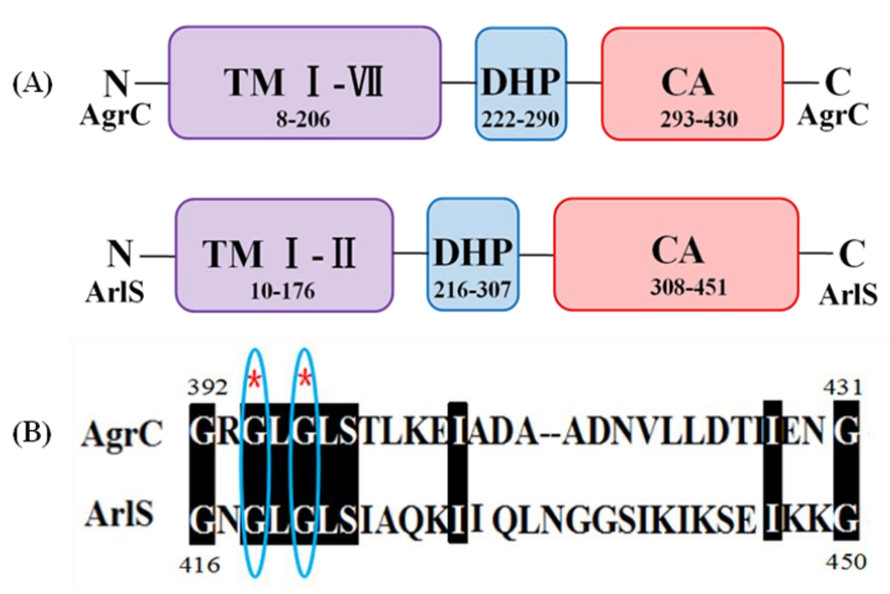


图 1 AgrC 蛋白和 ArlS 蛋白二级机构预测及同源性分析图

Fig 1. The homogeneity analysis result and the putative periplasmic region of ArlS and AgrC proteins. (A) The putative periplasmic region of ArlS and AgrC proteins. The transmembrane segments, dimerization and histidine phosphotransfer regions (DHP) subdomain, and catalytic and ATP-binging (CA) subdomain are indicated by purple, blue and red boxes, respectively. (B) The homogeneity analysis result of AgrC and ArlS

ArlRS 双组份系统的信号传递通过组氨酸激酶 ArlS 磷酸化实现，组氨酸的磷酸基团转移到反应调节蛋白接受域的天冬氨酸残基上，从而调控目的基因的

表达或目的蛋白的功能发生适应性变化。ArlS 蛋白可以捕捉胞外信号并且能够发生磷酸化，启动信号转导过程[16, 17]，因而 ArlS 的胞内域被认为是调控毒力因子表达的重要功能域。

ArlS 蛋白属于组氨酸激酶蛋白，文献报道[18]该蛋白与双组份信号转导系统中的其他组氨酸蛋白具有同源性。经过序列的同源性分析，结果显示 ArlS 蛋白与 AgrC 蛋白具有较高的同源性。目前对于 AgrC 蛋白的研究较为透彻，已经成功解析了 AgrC 蛋白 CA 域（结合 ATP 并磷酸化组氨酸残基的 C 末端催化域）的晶体结构[19]。有文献介绍[19, 20]AgrC 蛋白的 394 和 396 位氨基酸残基在其自磷酸化过程中起着关键作用，根据同源性比对分析结果推测 ArlS 蛋白的 418 位和 420 位氨基酸残基可能是 ArlS 蛋白自磷酸化过程中的具有重要功能的氨基酸。由于 ArlS 蛋白控制磷酸化的功能域位于蛋白胞内域部分，因此本文首先以 ArlS 蛋白的胞内域部分即 $ArlS_{CA}$（残基数 294-451）为目标蛋白，进行相关的活性研究。同时，本文利用定点突变的研究方法，构建了 418 位和 420 位氨基酸残基突变的 ArlS 蛋白即 $ArlS_{CAG418A}$ 和 $ArlS_{CAG420A}$，并利用 Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay 方法测定激酶活性，以检测 418 位和 420 位氨基酸残基在 $ArlS_{CA}$ 蛋白自磷酸化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用引物均由 Invitrogen (上海)贸易有限公司合成，限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I 酶，Ex Taq DNA 聚合酶，T4 Ligase 均购自大连宝生物工程公司。

1.2 $ArlS_{CA}$、ArlR、$ArlS_{CA-G418A}$ 及 $ArlSC_{A-G420A}$ 表达载体的构建

根据 NCBI 登记的 ArlS 和 ArlR 蛋白的碱基序列，以及载体 pProEX-HTa 的多克隆酶切位点，利用 clone manager 软件设计上下游引物，分别引入 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点。ArlR 的引物信息如下：上游引物 F-ArlR:5’-GGG<u>CCATGG</u>ATATATGACGCAAATTTTA-3’（划线部分为 *Nco* I 酶切位点）；下游引物 R-ArlR:5’-GGG<u>CTCGAG</u>TCATCGTATCACATACCC-3’（划线部分为 *Xho* I 酶切位点）。ArlS 的引物信息如下：上游引物 F-$ArlS_{CA}$:5’-GGG<u>CCATGG</u>ATAAAGGAGATGTAAATGAC-3’（划线部分为 *Nco* I 酶切位点）；下游引物 R-$ArlS_{CA}$:5’-GGG<u>CTCGAG</u>TTAAAATATGATTTTAAA-3’（划线部分为 *Xho* I 酶切位点）。A

rlS 蛋白的第 418 位、420 位氨基酸 G 突变为 A，构建 418 位突变菌株 ArlS$_{CA-G418A}$和 420 位突变菌株 ArlS$_{CA-G420A}$。ArlS$_{CA-G418A}$的引物信息如下：上游引物 F-ArlS$_{CA-G418A}$:5’-CAAGGCGGTAATGCGCTCGGATTATCT-3’；下游引物 R-ArlS$_{CA-G418A}$:5’-AGATAATCCGAGCGCATTACCGCCTTG-3’。ArlS$_{CA-G420A}$的引物信息如下：上游引物 F-ArlS$_{CA-G420A}$:5’-GGTAATGGTCTCGCGTTATCTATTGCG-3’；下游引物 R-ArlS$_{CA-G420A}$:5’-CGGAATAGATAACGCGAGTCCATTACC-3’。

以金黄色葡萄球菌基因组为模板，体系中加入上下游引物、Taq DNA 聚合酶及缓冲液，进行 PCR 反应，切胶回收 PCR 扩增产物。将目的基因和 pProEX-HTa 质粒用 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行双酶切，用 T4 DNA 连接酶将载体与目的基因连接得到重组质粒，用化学转化法将重组质粒转入大肠杆菌 DH5α感受态细胞中。对转化成功的菌株提质粒，送至生物公司测序。

1.3 ArlS$_{CA}$、ArlR、ArlS$_{CA-G418A}$及 ArlSC$_{A-G420A}$蛋白的表达

将测序成功的表达载体 1 μL 用化学转化法转入 *E.coli* BL21(RIL)感受态细胞中，涂布于含有 100 μg/mL 氨苄霉素的 LB 固体培养基上过夜培养。挑取单菌落接种于 20 mL 含有 100 mg/L 氨苄霉素的液体 LB 培养基中，37℃ 恒温震荡过夜培养后按 1%的接种量接种到 200 mL 液体 LB 培养基中，37℃ 震荡培养至 OD_{600} 在 0.6 时，取出 20 mL 样品作为诱导前样品，其余加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG，30℃ 培养 8 h 后收集菌体。

将收集的菌体用缓冲液（20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl , pH8.0）悬浮后进行超声破碎，13,000 rpm 离心 50 min，保存上清液作为粗提液备用。分取诱导前后的上清液用 15%的 SDS-PAGE 检测蛋白的诱导表达情况。

1.4 ArlS$_{CA}$、ArlR、ArlS$_{CA-G418A}$及 ArlSC$_{A-G420A}$蛋白的纯化

将诱导后的 ArlS$_{CA}$、ArlR、ArlS$_{CA-G418A}$及 ArlS$_{CA-G420A}$的上清液依次进行金属离子螯合层析（Ni^{2+}-NTA 柱），离子交换层析和凝胶过滤层析。

用金属离子螯合层析对 ArlS$_{CA}$、ArlR、ArlS$_{CA-G418A}$及 ArlS$_{CA-G420A}$蛋白进行初步分离纯化，纯化过程见参考文献[25]，纯化后的蛋白用 15%的 SDS-PAGE 检测蛋白纯化效果。

用离子交换层析对 ArlR 蛋白进行进一步的分离纯化[25]。先用 Buffer B（20 mM Tris-HCl，1M NaCl，2 mM β-Me，pH8.0，0.22 μm 滤膜过滤）洗阴离子交

换柱(Hi Trap Q ，5 mL)中可能残留的蛋白，再用 Buffer A（20 mM Tris-HCl，2 mM β-Me，pH8.0）洗去柱子中的盐离子，然后将待纯化的蛋白与离子交换柱结合，用 Buffer B、Buffer A 的混合液对目的蛋白进行梯度洗脱，在 280 nm 波长下监测洗脱结果并收集目标样品。根据洗脱峰谱图，选择样品用 15%的 SDS-PAGE 进行检测分析，回收目的蛋白，浓缩至 5 mL 备用。

用凝胶过滤层析再次纯化 ArlR 蛋白。在 AKTA 层析系统上利用凝胶过滤柱（HiLoad™ 16/600，Superdex™ 200 pg）纯化蛋白，缓冲液（20 mM Tris-HCl，150 mM NaCl，2 mM β-Me）流速 0.5 mL/min，在 280 nm 波长下监测结果并收集目标样品。根据洗脱峰谱图，选择样品用 15%的 SDS-PAGE 进行检测分析，回收目的蛋白，浓缩后保存备用。

1.5 圆二色谱检测 ArlR 蛋白的二级结构

待测的 ArlR 蛋白溶于缓冲液(20 mM HEPES, 150 mM NaCl，pH 8.0)中，浓度为 0.2 mg/mL，圆二色谱(circular dichroism, CD, JASCO-J1500 spectropolarimeter)的分析条件如下：带宽 3 nm，响应时间 1 s，测量范围 190-300 nm，重复测量次数为 5 次。

1.6 $ArlS_{CA}$、$ArlS_{CA\text{-}G418A}$及 $ArlS_{CA\text{-}G420A}$蛋白激酶活性的测定

$ArlS_{CA}$、$ArlS_{CA\text{-}G418A}$ 及 $ArlS_{CA\text{-}G420A}$ 蛋白激酶活性测定采用 Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay 方法，具体实验步骤参见试剂盒说明。实验在 96 孔板中进行，反应体系 50 μL，含有终浓度为 10 mM 的 $MgCl_2$ 和 5 μM 的 ATP，0-20 μmol/L 的目的蛋白，反应缓冲液为凝胶过滤层析缓冲液。37 ℃ 孵育 10 min，加入 50 μL 发光试剂，37 ℃ 反应 10 min，用多功能酶标仪检测体系的发光强度。

1.7 $ArlS_{CA}$蛋白的体外磷酸化实验

$ArlS_{CA}$ 蛋白磷酸化 ArlR 蛋白的实验通过体外磷酸化的方法进行测定，反应体系为 50 μL，含有 100 μM ATP，400 μM 氯化镁，10 mM β-巯基乙醇，50 μg ArlR 蛋白，20 μg $ArlS_{CA}$ 蛋白，反应体系分别在 37℃孵育 1 h、2 h、4 h 后，用 12%的 SDS-PAGE 和 western blot 检测磷酸化效果。

2 结果

2.1 $ArlS_{CA}$和 ArlR 蛋白的诱导表达

表达载体构建成功后对菌种进行扩培，用 15%的 SDS-PAGE 检测添加诱导

剂后目的蛋白的表达量是否增加，$ArlS_{CA}$蛋白的理论分子量约为 25 kDa，ArlR 蛋白的理论分子量约为 30 kDa。图 2 中实验组条带 2、4 与对照组条带 1、3 对比可知，条带 2、4 在分子量接近 25 kDa 和 30 kDa 的位置蛋白表达量明显增多，可判断经过 IPTG 诱导后 $ArlS_{CA}$ 和 ArlR 蛋白表达成功。

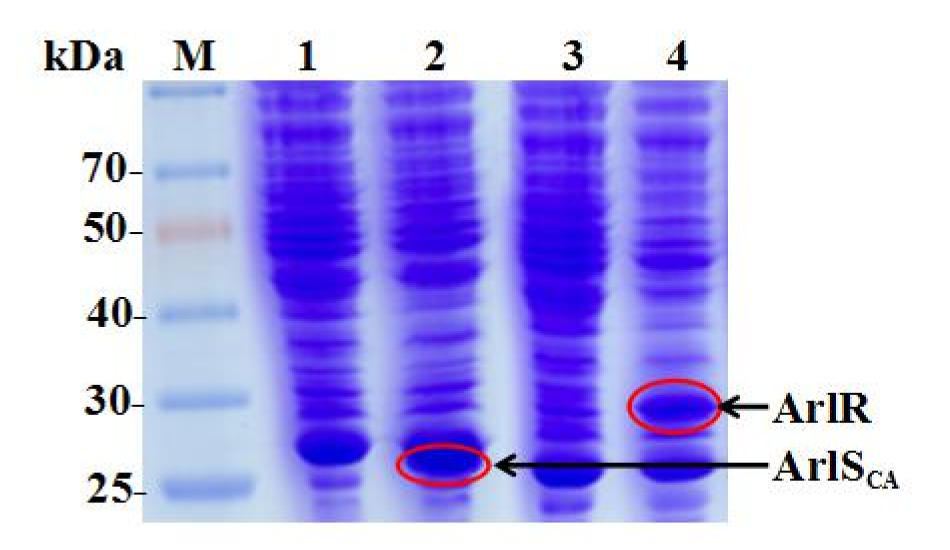


图 2 $ArlS_{CA}$和 ArlR 蛋白诱导表达结果图

Fig 2. The induced expression of $ArlS_{CA}$ and ArlR. M: marker; 1: $ArlS_{CA}$ without IPTG; 2: $ArlS_{CA}$ induced by IPTG; 3: ArlR without IPTG; 4: ArlR induced by IPTG.

2.2 $ArlS_{CA}$、ArlR、$ArlS_{CA-G418A}$及 $ArlS_{CA-G420A}$蛋白的分离纯化

由于 pProEX-HTa 表达载体中有组氨酸标签，利用组氨酸的咪唑基与镍金属离子的亲和力的差异可以实现对目的蛋白的分离纯化，因此实验中首先利用镍金属离子螯合层析对 $ArlS_{CA}$、ArlR、$ArlS_{CA-G418A}$及 $ArlS_{CA-G420A}$蛋白进行分离纯化，再用离子交换层析及凝胶过滤层析对 ArlR 蛋白进行进一步纯化。纯化后的蛋白用 15%的 SDS-PAGE 检测结果，由图 3 可知，经镍柱分离纯化后 $ArlS_{CA}$ 蛋白的纯度可达 90%以上，经测定产量约为 15 mg/L，ArlR 蛋白经三种层析技术分离纯化后纯度可达 98%，产量约为 25 mg/L，将纯化后的目的蛋白收集浓缩后保存备用。

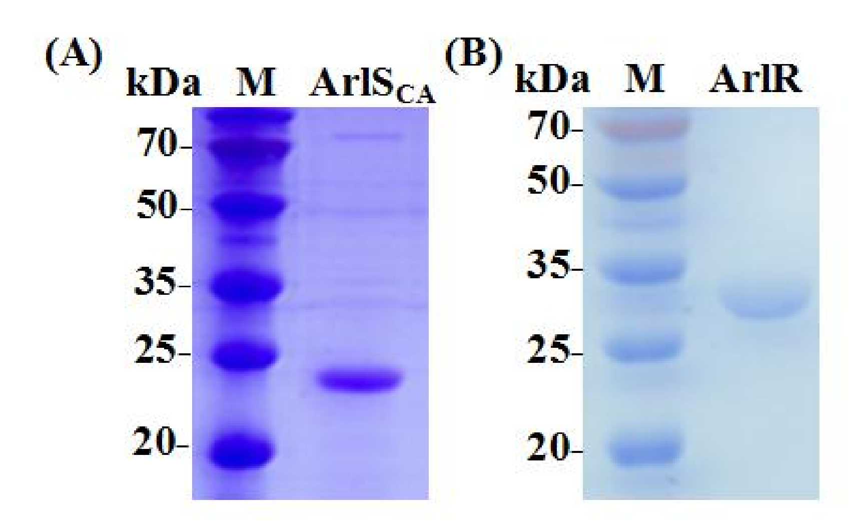


图 3 $ArlS_{CA}$ 和 ArlR 蛋白纯化结果图

Fig 3. The result of the purification of $ArlS_{CA}$ and ArlR protein. (A) The result of the purification of $ArlS_{CA}$ protein. M: marker; 1: $ArlS_{CA}$ protein. B) The result of the purification of ArlR protein. M: marker; 1: ArlR protein.

2.3 ArlR 蛋白二级结构的测定

ArlR 蛋白是 arl 双组份信号转导系统的转录因子，文献报道转录因子通常含有一定数量的螺旋结构且不稳定[21]，因此实验中用圆二色谱检测纯化后的 ArlR 蛋白的二级结构，结果如图 4 所示。从图中可知 ArlR 蛋白在 208 nm 处有一个负峰，这是α-螺旋结构的特征峰，可以判断纯化后的 ArlR 蛋白具有稳定的二级结构，可以作为有效底物验证 $ArlS_{CA}$ 蛋白的激酶活性。

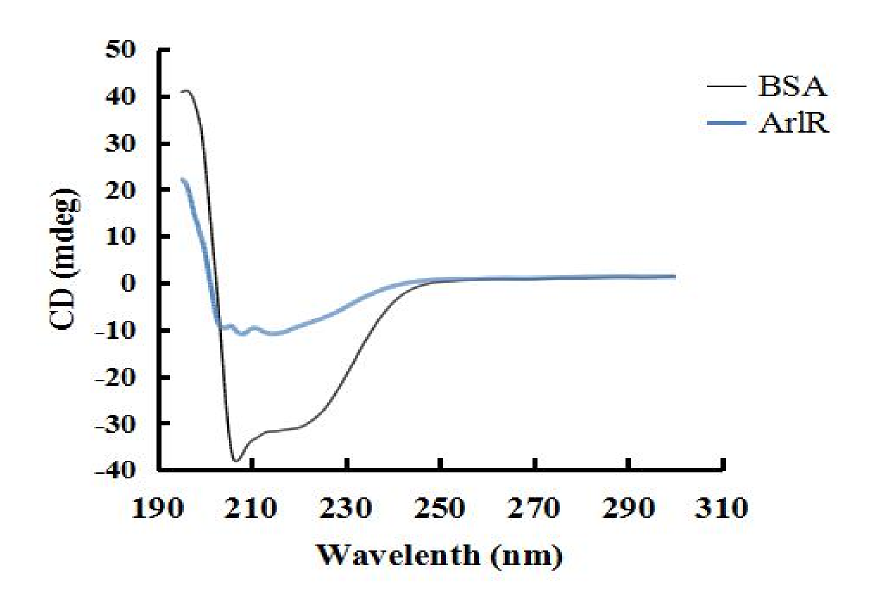


图 4 ArlR 蛋白的圆二色谱检测图

Fig 4. Circular dichroism spectra of ArlR and bovine serum albumin (BSA).

2.4 $ArlS_{CA}$蛋白激酶活性的研究

2.4.1 $ArlS_{CA}$蛋白激酶活性的测定

本文中对 $ArlS_{CA}$ 蛋白激酶活性的测定是通过检测反应体系中剩余的 ATP 含量来间接得到的。底物在磷酸激酶的作用下与 ATP 发生反应，反应结束后，在反应体系中加入甲壳荧光素，使其与反应体系中剩余的 ATP 作用，形成氧化荧光素，进而发出荧光。为了检测目的蛋白是否具有激酶活性，在反应体系中分别添加了 0 μg、5 μg、10 μg、20 μg、40 μg 的目的蛋白，并进行激酶活性的检测，检测结果如图 5 所示，从图中可以看出随着蛋白含量的增多，荧光值呈下降的趋势，这表明反应体系中剩余的 ATP 含量逐渐降低，即随着蛋白含量的增加蛋白的激酶活性逐渐增大，因此可以证明纯化后的 $ArlS_{CA}$ 蛋白具有激酶活性。

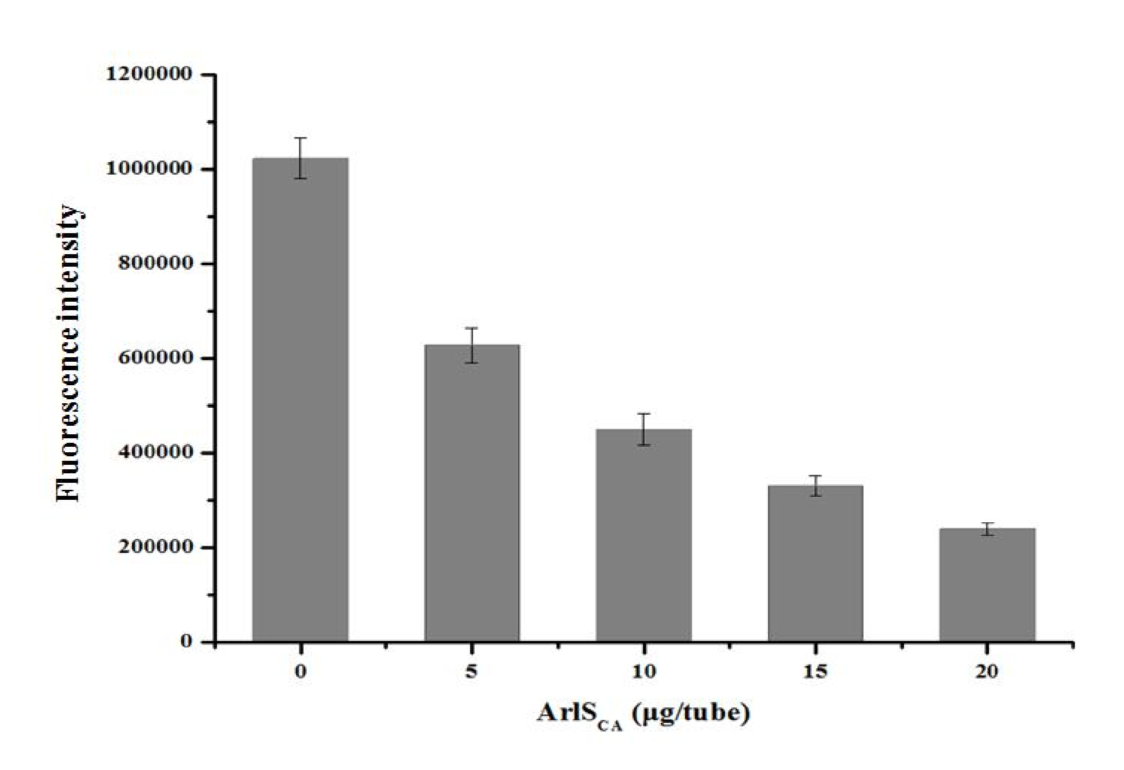


图 5 $ArlS_{CA}$ 蛋白激酶活性的测定结果

Fig 5. The kinase activity of $ArlS_{CA}$ protein.

2.4.2 $ArlS_{CA}$蛋白磷酸化作用

利用体外磷酸化实验来验证 $ArlS_{CA}$ 蛋白是否可以磷酸化 ArlR 蛋白，实验结果分别用 western blot 和 12%的 SDS-PAGE 检测。图 6 中条带 1 与 2 均为对照组，反应体系经不同时间孵育后检测结果见条带 3-5，与对照组相比 $ArlS_{CA}$ 蛋白

无明显变化，而部分 ArlR 蛋白分子量出现上移现象，是磷酸化的表现，据此判断 $ArlS_{CA}$ 蛋白可以磷酸化 ArlR 蛋白。

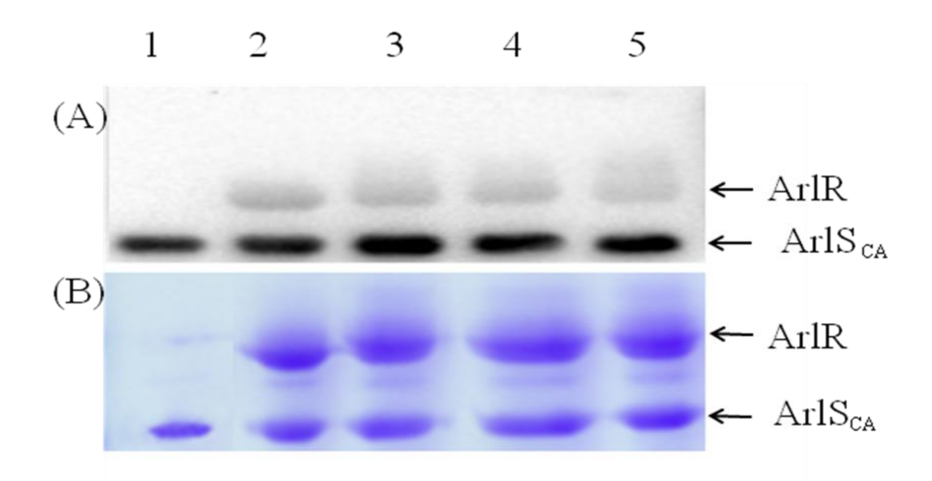


图 6 $ArlS_{CA}$ 蛋白与 ArlR 蛋白作用结果图

Fig 6. Cooperative activity of $ArlS_{CA}$ with ArlR. (A) Cooperative activity of $ArlS_{CA}$ with ArlR measured by western blot; (B) Cooperative activity of $ArlS_{CA}$ with ArlR measured by 12% SDS-PAGE. M: marker; 1: 20 μg $ArlS_{CA}$; 2: 20 μg $ArlS_{CA}$ and 50 μg ArlR , and then detect immediately; 3: 20 μg $ArlS_{CA}$ and 50 μg ArlR incubated in 37℃ for 1 h; 4: 20 μg $ArlS_{CA}$ and 50 μg ArlR incubated in 37℃ for 2 h; 5: 20 μg $ArlS_{CA}$ and 50 μg ArlR incubated in 37℃ for 4 h.

2.5 G_{418} 和 G_{420} 是 ArlS 蛋白自磷酸化过程中的具有重要功能的氨基酸

2.5.1 $ArlS_{CA-G418A}$ 和 $ArlS_{CA-G420A}$ 蛋白的分离纯化

利用酶切酶连的方法构建 418 位和 420 位氨基酸突变的重组菌株 BL21(RIL)-$ArlS_{CA-G418A}$ 和 BL21(RIL)-$ArlS_{CA-G420A}$，用金属离子螯合层析技术纯化 $ArlS_{CA-G418A}$ 和 $ArlS_{CA-G420A}$ 蛋白，纯化结果用 15%的 SDS-聚丙烯酰氨凝胶电泳检测，由图 7 可知纯化后的 $ArlS_{CA-G418A}$(条带 2)和 $ArlS_{CA-G420A}$(条带 3)分子量约为 25 kDa，与 $ArlS_{CA}$(条带 1)分子量一致，$ArlS_{CA-G418A}$ 和 $ArlS_{CA-G420A}$ 蛋白的纯度均可达 90%。

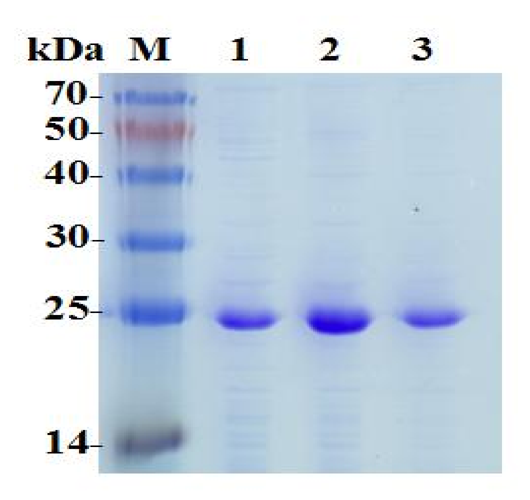


图 7 ArlS$_{CA-G418A}$和 ArlS$_{CA-G420A}$蛋白纯化结果图

Fig 7. The result of the purification of ArlS$_{CA-G418A}$ and ArlS$_{CA-G420A}$. M: marker; 1: ArlS$_{CA}$; 2: ArlS$_{CA-G418A}$; 3: ArlS$_{CA-G420A}$.

2.5.2 ArlS$_{CA-G418A}$和 ArlS$_{CA-G420A}$蛋白激酶活性的检测

反应体系中添加 0-30 μg 的目的蛋白，检测激酶活性，由图 8 可见随着 ArlS$_{CA-G418A}$和 ArlS$_{CA-G420A}$蛋白含量的增多，反应体系的荧光值基本持平，无明显变化趋势，这表明反应体系中剩余的 ATP 含量没有发生明显变化，即纯化后的 ArlS$_{CA-G418A}$和 ArlS$_{CA-G420A}$蛋白没有激酶活性，并未发生自磷酸化作用，因此可以证明 418 和 420 位氨基酸残基与 ArlS 蛋白自磷酸化密切相关，在 ArlS 蛋白的自磷酸化过程中起着十分重要的作用。

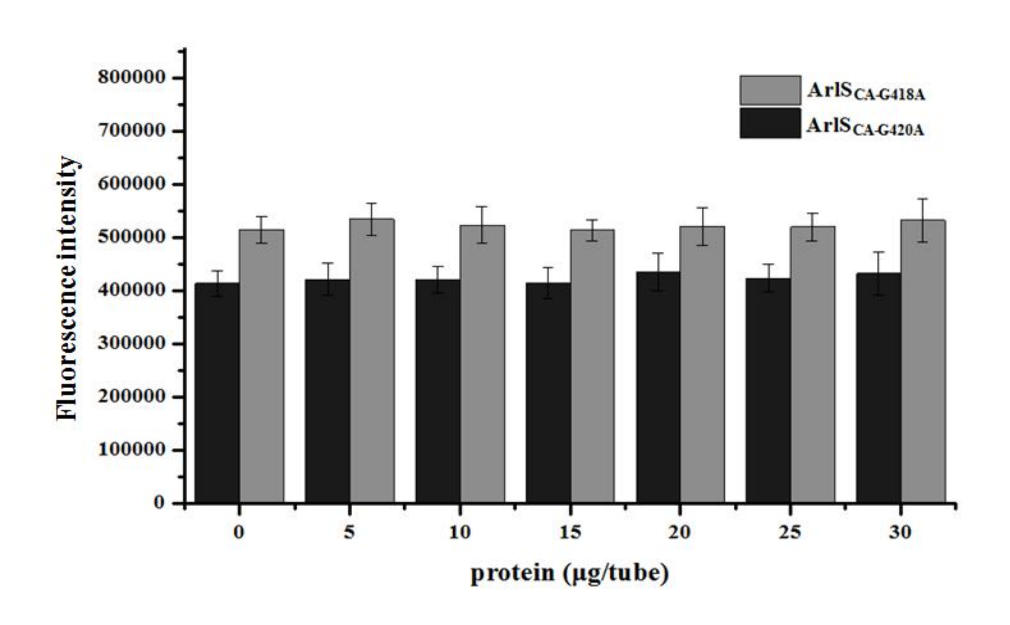


图 8 ArlS$_{CA-G418A}$ 和 ArlS$_{CA-G420A}$ 蛋白激酶活性的测定结果

Fig 8. The kinase activity of ArlS$_{CA-G418A}$ and ArlS$_{CA-G420A}$ protein.

3 讨论

金黄色葡萄球菌 arl 系统与其致病性密切相关，有文献报道，ArlSR 双组份信号转导系统可调节上百种基因的转录，参与细菌的生长和分裂，与细菌的聚集作用有关，可以下调表面蛋白 A，α-溶血素，β-溶血素，凝固酶等多种毒力因子 [2,3,22]。已有研究表明双组份信号转导系统中的组氨酸蛋白激酶可捕捉胞外信号，发生自磷酸化并磷酸化下游的反应调控蛋白，进而调控相关基因的表达 [16,17,23-25]。本研究证实在 arl 系统中，组氨酸蛋白激酶 ArlS 可以在其胞浆域的磷酸化位点处发生自磷酸化作用，随后将磷酸基团转移给下游的反应调控蛋白 ArlR，启动整个 arl 双组份信号转导过程。

众多的研究表明，膜蛋白的结构和功能较为复杂[23]，本实验在对膜蛋白进行相关研究之前，利用多种在线软件对其拓扑结构进行预测，选定膜蛋白胞内域部分作为研究对象展开实验，一方面 ArlS 蛋白的磷酸化位点在其胞内域部分，并不影响对其自磷酸化等相关功能研究；另一方面避开了膜蛋白表达量极低且分离纯化较为困难的问题。

为了阐明组氨酸蛋白激酶 ArlS 自磷酸化过程中起关键作用的氨基酸，实验中采用定点突变的研究技术，该技术可通过改变特定氨基酸获得突变蛋白质，然后对突变蛋白质进行功能研究，进而从微观水平上阐明正常状态下基因的调控机理[26, 27]。金葡菌双组份信号转导系统中的组氨酸蛋白具有同源性，通过同源性分析结果得知 ArlS 蛋白与 AgrC 蛋白具有较高的同源性，二者在功能上也较为相近，均为膜蛋白，可以感知外界环境的刺激因素，发生自磷酸化并将磷酸基团转移至反应调控蛋白，开启整个信号转导通路。有研究报道[19, 20]，AgrC 蛋白的 394 和 396 位氨基酸残基与其自磷酸化有关，根据同源性比对分析结果推测 ArlS 蛋白的 418 位和 420 位氨基酸残基可能是 ArlS 蛋白自磷酸化过程中的具有重要功能的氨基酸。因此本研究将 $ArlS_{CA}$ 蛋白的 418 位 420 位氨基酸残基进行定点突变，对其自磷酸化作用进行检测，结果证实 $ArlS_{CA}$ 蛋白的 418 和 420 位氨基酸残基是 $ArlS_{CA}$ 蛋白自磷酸化过程中的关键氨基酸，起着十分重要的作用。

本研究为进一步阐明 arl 双组份信号转导系统的作用机理以及新的药物靶点的开发奠定了基础，为后续对 ArlS 蛋白、ArlR 蛋白三级结构的研究，晶体结构

的解析提供了一定帮助。

参考文献

[1] Thompson K A, Copley V R, Parks S, et al. *Staphylococcus aureus* dispersal from healthy volunteers. AM J INFECT CONTROL, 2014, 42(3): 260-264.

[2] 宋娟, 楚雍烈. 金黄色葡萄球菌基因调节系统研究进展. 生命科学, 2012, 24(5): 463-469.

Song J, Chu Y L. Advances in research of gene regulation sustems in *Staphylococcus aureus*. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2012, 24(5): 463-469.

[3] Junecko J M, Zielinska A K, Mrak L N, et al. Transcribing virulence in *Staphylococcus aureus*. WJCID, 2012, 2(4): 63-76.

[4] 路荣, 韩文瑜. 金黄色葡萄球菌调控基因 agr 及 sae 对其耐热核酸酶分泌的影响. 河北科技师范学院学报, 2010, 24(4): 28-31.

Lu R, Han W Y. Isolation and Analysis of Non-tuberculous *Mycobacteria* from Bovine. Journal of Hebei Normal University of Sci and Tech, 2010, 24(4): 28-31.

[5] Rasko D A, Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(2): 117－128.

[6] Barczak A K, Hung D T. Productive steps toward an antimicrobial targeting virulence. Curr Opin Microbiol, 2009, 12(5): 490－496.

[7] Cegelski L, Marshall G R, Eldridge G R, et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(1): 17－27.

[8] Dancer S J, Kirkpatrick P, Corcoran D S, et al. Approaching zero: Temporal effects of a restrictive antibiotic policy on hospital-acquired Clostridium difficile, extended-spectrum -lactamase-producing coliforms and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents, 2013, 41(2): 137－142 .

[9] Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet, 1997, 350(9092): 1670–1673.

[10] Weigel L M, Clewell D B, Gill S R, et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science, 2003, 302(5650): 1569–1571.

[11] Fournier B, Hooper D C. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extra cellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. J BACTERIOL, 2000, 182(14): 3955-3964.

[12] Lindsay J A, Foster S J. Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. Mol Gen Genet, 1999, 262(20): 323-331.

[13] 于冰, 杨光, 邵宁生. 金黄色葡萄球菌中二元调控系统 agr 及与其他二元系统相互作用的研究进展. 军事医学科学院院刊, 2007, 31(2): 187-190.

Yu B, Yang G, Shao N S. Advances in the research on two-component regulatory system, agr, and its in teraction with other two-component systems in *Staphylococcus aureus*. Acad Mil Med Sci, 2007, 31(2): 187-190.

[14] Walker J N, Crosby H A, Spaulding A R, et al. The *Staphylococcus aureus* ArlRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis. PLoS Pathog, 2013, 9(12): 1-17.

[15] 李明, 胡福泉, 唐家琪. 二元信号转导系统与细菌的致病性. 微生物学杂志, 2007, 27(1): 58-62.

Li M, Hu F Q, Tang J Q. Dual Signal Transduction System and Bacterial Pathogenicity. J MICROBIOL, 2007, 27(1): 58-62.

[16] Mascher T, Helmann J D, Unden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(4): 910–938.

[17] Gao R, Stock A M. Biological insights from structures of two-component proteins. Annu Rev Microbiol, 2009, 1(63):133–154.

[18] Galperin M Y. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. BMC Microbiol, 2005, 5(35): 1-19.

[19] Sandeep K S, Kalagiri R, Aneesa F, et al. Influence of the AgrC-AgrA complex in the response time of *Staphylococcus aureus* quorum sensing. J BACTERIOL, 2014, 196(15): 2876-2888.

[20] Wang B Y, Zhao A, Novick R P, et al. Activation and inhibition of the receptor histidine kinase AgrC occurs through opposite helical transduction motions. MOL CELL, 2014, 53(6): 929-940 .

[21] 张艳馥, 沙伟. 转录因子概述. 生物学教学, 2009, 34(10): 7-8.

Zhang Y F, Sha W. The summary of transcription factors. Biol Teach, 2009, 34(10): 7-8.

[22] Liang X, Zheng L, Landwehr C, et al. Global regulation of gene expression by ArlRS, a two component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2005, 187(15): 5486-92.

[23] Wang L N, Quan C S, Xiong W, et al. New Insight into Transmembrane Toplogy of *Staphylococcus aureus* Histidine Kinase AgrC. Biochim Biophys Acta, 2014,1838(3): 988-993.

[24] Wu Y, Liu J G, Jiang J, et al. Role of the two-component regulatory system arlRS in ica operon and aap positive but non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* isolates from hospitalized patients. MICROB PATHOGENESIS, 2014, 76 (2014): 89-98.

[25] 王路路, 权春善, 许永斌, 等. 跨膜蛋白 AgrC$_{TM6-7C}$ 分离纯化方法的优化. 生物技术通报, 2016, 32(7): 59-65.

Wang L L, Quan C S, Xu Y B, *et al*. Optimization of the Purification Method for Transmembrane Protein AgrC$_{TM6-7C}$ [J]. BIOTECHNOL BULL, 2016, 32(7): 59-65.

[26] 张浩, 毛秉智. 定点突变技术的研究进展. 免疫学杂志, 2000, 16(4): 108-110.

Zhang H, Mao B Z. Advance in technology of site-directed mutagenesis. Immunol J, 2000, 16(4): 108-110.

[27] Zhang B, Wan F, Qiu Y L, et al. Increased L-arginine Production by Site-directed Mutagenesis of N-acetyl-L-glutamate Kinase and proB Gene Deletion in *Corynebacterium crenatum*. Biomed Environ Sci, 2015, 28(12): 864-874.